

## VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Yuriko SUKENOBU, c/o YuNeed International Patent Office of  
6<sup>th</sup> Floor, Akiba Bldg., 4-1, Higashi Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku,  
Tokyo 103-0004 Japan

declare as follows:

1. That I am well acquainted with both the English and Japanese languages, and
2. That the attached document is a true and correct translation made by me to the best of my knowledge and belief of:
  - (a) The specification accompanying the Japanese Patent Application No. 2004-036845 filed on February 13, 2004.

Sep. 25, 2009  
Date

Yuriko Sukenobu  
Yuriko SUKENOBU

[Document] Application for Patent

[Arrangement Number] 4-1009715

[Addressed to] Commissioner of Patent Office

[International Classification] C12N 5/06

[Inventor]

[Address or Domicile] 273-7, Iwakura-nishigawaracho,  
Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto

[Name] NAKATSUJI, Norio

[Inventor]

[Address or Domicile] Eaglecourt-shogoin 402, 4-14,  
Shogoin-kawaracho, Sakyo-ku, Kyoto-shi

[Name] SUEMORI, Hirofumi

[Inventor]

[Address or Domicile] c/o Asahi Techno Glass Corporation,  
50-1, Gyoda 1-chome, Funabashi-shi, Chiba

[Name] ASAKA, Isao

[Inventor]

[Address or Domicile] c/o Asahi Techno Glass Corporation,  
50-1, Gyoda 1-chome, Funabashi-shi, Chiba

[Name] SUGAI, Harumi

[Inventor]

[Address or Domicile] c/o Asahi Techno Glass Corporation,  
50-1, Gyoda 1-chome, Funabashi-shi, Chiba

[Name] OKAMOTO, Reiko

[Applicant for Patent]

[Identification Number] 501373049

[Name or Nomenclature] NAKATSUJI, Norio

[Applicant for Patent]

[Address or Domicile] Eaglecourt-shogoin 402, 4-14,  
Shogoin-kawaracho, Sakyo-ku, Kyoto-shi

[Name or Nomenclature] SUEMORI, Hirofumi  
[Applicant for Patent]  
[Identification Number] 000158208  
[Name or Nomenclature] ASAHI TECHNO GLASS CORPORATION  
[Applicant for Patent]  
[Identification Number] 000002956  
[Name or Nomenclature] TANABE SEIYAKU CO., LTD.  
[Attorney]  
[Identification Number] 100088904  
[Patent Attorney]  
[Name or Nomenclature] SHOJI, Takashi  
[Elected Attorney]  
[Identification Number] 100124453  
[Patent Attorney]  
[Name or Nomenclature] SUKENOBU, Yuriko  
[Elected Attorney]  
[Identification Number] 100129160  
[Patent Attorney]  
[Name or Nomenclature] FURUDATE, Kuniko  
[Description of Charge]  
[Prepaid Book Number] 067070  
[Amount Prepaid] 21,000 yen  
[List of Submitted Documents]  
[Matter] Scope of Claims 1  
[Matter] Specification 1  
[Matter] Drawings 1  
[Matter] Abstract 1

[Document] Scope of Claims

[Claim 1] A culture medium for preparation of feeder cells for embryonic stem cells, comprising serum albumin, insulin and a basal medium, wherein the amount of said serum albumin is from 2 g/L to 50 g/L, the amount of said insulin is from 1 mg/L to 100 mg/L, and said basal medium is at least one kind selected from MEM,  $\alpha$ -MEM, DMEM, IMDM, Ham F10, Ham F12, Medium 199, RPMI 1640, RITC 80~7, MCDB 104, MCDB 105, MCDB 153, MCDB 201 and MCDB 202.

[Claim 2] The culture medium according to claim 1 further comprising a cell adhesion factor.

[Claim 3] The culture medium according to claim 2, wherein the cell adhesion factor is at least one kind selected from collagen, gelatin, fibronectin, vitronectin, laminin, polylysine, polyornithine and polyethyleneimine.

[Claim 4] The culture medium according to claim 1, 2 or 3 further comprising a cell growth factor.

[Claim 5] The culture medium according to claim 4, wherein the cell growth factor is at least one kind selected from fibroblast growth factor and epithelial cell growth factor.

[Claim 6] A method for preparation of feeder cells for embryonic stem cells comprising the steps of:

culture and proliferation a cell population comprising at least one kind of cells selected from fetal

skin fibroblasts, fetal myofibroblasts, fetal lung fibroblasts, fetal epithelial cells, fetal endothelial cells, adult skin fibroblasts, adult lung fibroblasts, adult epithelial cells and adult endothelial cells in the culture medium for preparation of feeder cells for embryonic stem cells according to any one of claims 1 through 5, and

inactivation of proliferation of said cultured and proliferated cell population by mitomycin C or irradiation.

[Claim 7] The preparation method according to claim 6, wherein said culture and proliferation step is conducted in a culture vessel coated with a cell adhesion factor.

[Claim 8] The preparation method according to claim 7, wherein the cell adhesion factor is at least one kind selected from collagen, gelatin, fibronectin, vitronectin, laminin, polylysine, polyornithine and polyethyleneimine.

[Claim 9] The preparation method according to claim 6, 7 or 8, wherein in said culture and proliferation step, the cultured cells are allowed to undergo cell division twenty or more times on average.

[Claim 10] Feeder cells for embryonic stem cells obtained by the preparation method according to any one of claims 6 through 9.

[Document] Specification

[Title of the Invention] THE CULTURE MEDIUM FOR CULTURING FEEDER CELLS FOR EMBRYONIC STEM CELLS CULTURE AND THE PREPARED FEEDER CELLS

[Technical Field]

[0001]

The present invention relates to a culture medium for preparation of feeder cells for use in culturing embryonic stem cells including human's, the preparation method of feeder cells employing the culture medium, and the resulting feeder cells therefrom for embryonic stem cells.

[Background Art]

[0002]

Embryonic stem cells are undifferentiated cells derived from the inner cell mass of a blastocyst and have a pluripotency to differentiate into all tissue types; thereby its application is expected in the fields of cell culturing, tissue transplantation, drug discovery research, and gene therapy. Further, it is known that embryonic stem cells may be induced from a cloned embryo obtained by the nuclear transfer from adult somatic cells. Recently, technologies inducing embryonic stem cells to be developed into various tissues including nerve tissues have been reported, and as tissues developed from embryonic stem cells are genetically equivalent tissues without immunologically being eliminated, so that their application to transplantation and gene therapies has become expected. Further, subjects for which embryonic stem cells are produced have become diverse covering from experimental small animals to primates including human, and

the isolation of embryonic stem cells of rhesus monkey, the separation of that from a human ovum fertilized in vitro and the like have been reported.

[0003]

Further, Suemori et al. succeeded in newly develop to establish embryonic stem cells by intracytoplasmic sperm injection from a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) which is useful for preclinical studies and widely employed in medical researches, and shown its pluripotency maintained over a long period, and also confirmed that dopaminergic neurons are generated from the embryonic stem cells of a Cynomolgus monkey.

[0004]

Embryonic stem cells including human's described above have conventionally been cocultured with feeder cells to facilitate their growth. When culture of embryonic stem cells of a primate including, in particular, human using a serum, an undifferentiated state of them cannot be maintained, so that culture them with a serum-free medium has been studied (see patent document No.1).

[0005]

However, embryonic stem cells cannot be maintained when culture only with a serum-free medium, therefore feeder cells, which partly substitute for the effects of a serum, are essential for the coculture. As the feeder cells, for example, cells obtained by preparing fibroblasts from a fetal mouse and subjecting them to mitomycin C or irradiation to inactivate their proliferation have been used, so that coculture human embryonic stem cells on feeder layer derived from a mouse could lead to zoonosis and the

like. As this tissue induced and developed from human embryonic stem cells is expected to be as a material for transplantation and gene therapies, risks like zoonosis should desirably be eliminated as much as possible.

[0006]

Thus, instead of using a fetal mouse, methods using human fetal fibroblasts, adult oviduct epithelial cells (non-patent document No.1), human neonatal foreskin-derived fibroblasts (non-patent document No.2, 3), adult skin fibroblasts (non-patent document No.4) and human bone marrow cells (non-patent document No.5) as feeder cells have been reported.

[0007]

However, most of them use primary cells, thereby to obtain a large amount of human embryonic stem cells; materials derived from a plurality of donors are needed, so that checking on every donor for the contagium is also laboriously needed. In addition, these culture media for preparation of feeder cells derived from a human use a serum such as fetal bovine serum (FBS), leading a risk of spread of unknown pathogens such as unknown infections and prion from this serum.

[Patent document No.1] Pamphlet of International Publication No.98/30679

[Non-patent document No.1] Nat. Biotechnol.20:933-936  
(2002)

[Non-patent document No.2] Biol. Reprod.68:2150-2156  
(2003)

[Non-patent document No.3] Hum. Reprod.18:1404-1409  
(2003)

[Non-patent document No.4] Stem Cells.21:546-556  
(2003)

[Non-patent document No.5] Stem Cells.21:131-142  
(2003)

[Disclosure of the Invention]

[Problems to be Solved by the Invention]

[0008]

The object of the present invention is to provide a culture medium for preparation of feeder cells for embryonic stem cells, which can be used to efficiently establish feeder cells for use in culture of embryonic stem cells including human's from limited donor-derived materials and to culture them in a condition of a reduced risk of infection (hereinafter referred to as "a culture medium for preparation of feeder cells"). Also, a preparation method of feeder cells, which is relatively safe even when subjected to coculture with embryonic stem cells, and the resulting feeder cells there from are provided.

[Means to Solve the Problems]

[0009]

The present inventors had studied to solve the matters above and found that using a culture medium for preparation of feeder cells, comprising at least a serum albumin and insulin in a basal medium, a cell population capable of becoming feeder cells for embryonic stem cells and comprising at least one kind of cells selected from fetal skin fibroblasts, fetal fibroblasts, fetal lung fibroblasts, fetal epithelial and endothelial cells, adult skin and lung fibroblasts, adult epithelial and endothelial

cells can be stably proliferated, and they completed the present invention.

[0010]

Therefore, the present invention consists of the following.

1. A culture medium for preparation of feeder cells for embryonic stem cells, comprising serum albumin, insulin and a basal medium, wherein the amount of the serum albumin is from 2 g/L to 50 g/L, the amount of the insulin is from 1 mg/L to 100 mg/L, and the basal medium is at least one kind selected from MEM,  $\alpha$ -MEM, DMEM, IMDM, Ham F10, Ham F12, Medium 199, RPMI 1640, RITC 80-7, MCDB 104, MCDB 105, MCDB 153, MCDB 201 and MCDB 202.
2. The culture medium according to preceding aspect 1 further comprising a cell adhesion factor.
3. The culture medium according to preceding aspect 2, wherein the cell adhesion factor is at least one kind selected from collagen, gelatin, fibronectin, vitronectin, laminin, polylysine, polyornithine and polyethyleneimine.
4. The culture medium according to preceding aspects 1, 2 or 3 further comprising a cell growth factor.
5. The culture medium according to preceding aspect 4, wherein the cell growth factor is at least one kind selected from fibroblast growth factor and epithelial cell growth factor.
6. A method for preparation of feeder cells for embryonic stem cells comprising the steps of:

culture and proliferation a cell population comprising at least one kind of cells selected from fetal skin fibroblasts, fetal myofibroblasts, fetal lung

fibroblasts, fetal epithelial cells, fetal endothelial cells, adult skin fibroblasts, adult lung fibroblasts, adult epithelial cells and adult endothelial cells in the culture medium for preparation of feeder cells for embryonic stem cells according to any one of preceding aspects 1 through 5, and

inactivation of proliferation of the cultured and proliferated cell population by mitomycin C or irradiation.

7. The preparation method according to preceding aspect 6, wherein the culture and proliferation step is conducted in a culture vessel coated with a cell adhesion factor.

8. The preparation method according to preceding aspect 7, wherein the cell adhesion factor is at least one kind selected from collagen, gelatin, fibronectin, vitronectin, laminin, polylysine, polyornithine and polyethyleneimine.

9. The preparation method according to preceding aspects 6, 7 or 8, wherein in the culture and proliferation step, the cultured cells are allowed to undergo cell division twenty or more times on average.

10. Feeder cells for embryonic stem cells obtained by the preparation method according to any one of preceding aspects 6 through 9.

[Effects of Invention]

[0011]

With a culture medium for preparation of feeder cells of the present invention, feeder cells which are relatively safe even subjected to coculture with embryonic stem cells including human's can be established and cultured over a long period. Materials for feeder cells are derived from limited donors, for example, fetal skin fibroblasts, fetal

myofibroblasts, fetal lung fibroblasts, fetal epithelial cells, fetal endothelial cells, adult skin fibroblasts, adult lung fibroblasts, adult epithelial cells and adult endothelial cells and the like, therefore capability of a long-term culture is useful. With it, coculture of embryonic stem cells including human's with feeder cells for embryonic stem cells can be achieved, providing embryonic stem cells which have a reduced risk of zoonosis and the like in case of using embryonic stem cells as a material for transplantation and gene therapies.

[The best mode for carrying out the Present Invention]

[0012]

As a basal medium used in the present invention, any one of and/or a combination of a plurality of MEM,  $\alpha$ -MEM, DMEM, IMDM, Ham F10, Ham F12, Medium 199, RPMI 1640, RITC 80-7, MCDB 104, MCDB 105, MCDB 153, MCDB 201 and MCDB 202 can be used, preferably DMEM, IMDM, Ham F10, Ham F12, RITC 80-7, MCDB 104, MCDB 105, MCDB 201 and MCDB 202, which may be used for a serum-free medium for fibroblasts, and more preferably a formulated culture medium of DMEM and Ham F12 in 1:1, which may be used in a serum-free medium for embryonic stem cells from a primate, is used in view of nutritive value of a culture medium and the survival rate when coculture with embryonic stem cells after preparation of feeder cells.

Then, the detailed composition of a basal medium used in the present invention is based on sources described in Table 1.

[Table 1]

Table 1 Sources of basal media

basal media	Sources
<b>MEM, a-MEM, DMEM, IMDM, RPMI1640</b>	The Japanese Tissue Culture Association Ed. "Tissue Culture Technology", 3rd ed. (Advanced) 1996, p 581-583
<b>Medium 199, MCDB 104, MCDB 153</b>	The Japanese Tissue Culture Association Ed. "Tissue Culture Technology" in The 18th series of New Experimental Chemistry, 1990, p 27-29
<b>Han F10, Han F12, MCDB 105, MCDB 202</b>	Katsuma H. ed. "Nutritional Requirements of Cultured Cells" 1978 83-115
<b>MCDB 201</b>	Makrilia, W. L. and Ham, R. G. 1976 J. Cell Biol. 71 727-734
<b>RITC 80-7</b>	Yamane, I. et al. 1981 Exp. Cell Res. 134 470-474

[0013]

A culture medium for preparation of feeder cells used in the present invention comprising serum albumin and insulin as essential ingredients. This culture medium can further contain other ingredients. However, ingredients contain unknown ingredients such as fetal bovine serum (FBS) and contaminants and having a high possibility of causing infection and the like are inadequate.

[0014]

As other ingredients, there are ingredients not contained in the above-described basal medium, or ingredients though contained there but the amount is not enough. In particular, for example, cell adhesion factors, cell growth factors, metal-containing proteins such as transferrin, other polypeptides and proteins, amino acids, vitamins may be mentioned. These ingredients are formulated into a basal medium to produce a culture medium

for preparation of feeder cells. Further, such ingredients called serum replacements, which are commercially available, can be formulated into the basal medium described above to produce a culture medium for preparation of feeder cells. These serum replacements usually contain serum albumin and insulin, and further contain the other ingredients described above. Therefore, (a) serum replacement(s) can be used by formulating into the basal medium such that the amounts of serum albumin and insulin are to be the aimed amounts. As (a) serum replacement(s), for example, ones described in above patent document No.1 may be mentioned.

[0015] :

A culture medium for preparation of feeder cells in the present invention preferably comprising a cell adhesion factor as the other ingredient described above. In addition, a cell growth factor is preferably comprised. Further, a metal-containing protein such as transferrin is also preferably comprised. A cell adhesion factor is preferably at least one kind selected from collagen, gelatin, fibronectin, vitronectin, laminin, polylysine, polycornithine and polyethyleneimine, and in particular, collagen, gelatin, fibronectin and vitronectin are preferred. A cell growth factor is preferably at least one kind selected from fibroblast growth factor (FGF) and epithelial cell growth factor (EGF).

[0016]

A culture medium for preparation of feeder cells in the present invention essentially comprising serum albumin in a ratio of from 2 g/L to 50 g/L and insulin from 1 mg/L

to 100 mg/L. More preferred amounts are from 4 g/L to 25 g/L for serum albumin and from 5 mg/L to 30 mg/L for insulin.  
[0017]

Further, a cell adhesion factor is preferably contained at a concentration from 0.3 mg/L to 50 mg/L. However, a culture medium for preparation of feeder cells need not be formulated with a cell adhesion factor when that factor is used to coat the inner surface of a culture vessel as described below. Preferably, a cell growth factor is contained in a culture medium for preparation of feeder cells in a ratio of from 0.01 µg/L to 100 µg/L, and in particular, preferably a fibroblast growth factor from 0.1 µg/L to 10 µg/L, and more preferably an epithelial cell growth factor from 0.5 µg/L to 50 µg/L. A metal-containing protein such as transferrin is preferably contained in a ratio of from 1 mg/L to 50 mg/L.

[0018]

As cells available for establishing feeder cells for embryonic stem cells of the present invention, for example, at least one kind of cells from fetal skin fibroblasts, fetal myofibroblasts, fetal lung fibroblasts, fetal epithelial cells, fetal endothelial cells, adult skin fibroblasts, adult lung fibroblasts, adult epithelial cells and adult endothelial cells can be selected. A cell population comprising a selected cell species can be cultured and grown in a culture vessel containing a culture medium for preparation of feeder cells of the present invention under a condition in 3% to 10% CO<sub>2</sub> at a temperature of 35°C to 40°C for 1 to 30 days. After growing the cell population described above, cell proliferation can be

inactivated by mitomycin C or irradiation to obtain a large amount of feeder cells.

[0019]

As stated above, safe feeder cells for embryonic stem cells, which are almost free of zoonosis, can be grown under a serum-free culture and prepared by a preparation method comprising the steps of proliferation cells and inactivation of the proliferation. In the cell proliferation step described above, a culture vessel for cells can be coated with a cell adhesion factor beforehand. In the cell proliferation step, the cultured cells are allowed to undergo cell division twenty or more times on average, obtaining a large amount of feeder cells.

[Example]

[0020]

Examples and Comparative Examples of the present invention will be explained below but these Examples show just one implementation aspect for the purpose of assisting the reproduction of the present invention, so these Examples will never limit the present invention nor impose any restrictions on it. Now, in the following Examples, as feeder cells, a human cell line grown on a medium comprising fetal bovine serum (FBS) was used. That is due to our situation wherein human cells obtained directly from a human body were hardly available for an experiment material, which forces us to obtain and use an existing human cell line for research purpose in these experiments.

[0021]

(Example 1)

A normal human diploid lung fibroblast cell line

(MRC-5) obtained from Cell Bank and cultured into 41.77 PDL (population doubling Level (The Japanese Tissue Culture Association Ed. "Tissue Culture Technology", 3rd ed. (basic) 1996, p42)) in a medium of 10 v/v% FBS in MEM was suspended at a cell count of  $2.4 \times 10^6$  cells using the following culture medium for preparation of feeder cells (A), and then cultured into 42.99 PDL on a gelatin-coated dish through one-passage of subculture.

[0022]

Composition of a culture medium for preparation of feeder cells (A):

RITC80~7 medium added with 5 g/L bovine serum albumin (BSA), 10 µg/L EGF, 1 mg/L insulin and 1 mg/L hydrocortisone

[0023]

Then, the cultured MRC-5 described above was cultured for two to three hours using a culture medium for preparation of feeder cells (A) containing mitomycin C (MMC) at a final concentration of 10 µg/mL, followed by the inactivation of cell division. Then, the culture medium for preparation of feeder cells (A) containing MMC was removed and the cells were washed three times with phosphate buffer (PBS). The cells after washing were dissociated from the culture dish by trypsinization (0.25 w/v% trypsin, 1 mM EDTA) to count. As a result, approximately  $5.5 \times 10^6$  of feeder cells were obtained.

[0024]

(Example 2)

MRC-5 obtained from Cell Bank as in Example 1 was suspended at a cell count of  $2.1 \times 10^5$  cells using the following culture medium for preparation of feeder cells

(B), and the cells were subcultured four passages into 53.47 PDL on a gelatin-coated culture dish.

Then, the cultured MRC-5 described above were cultured for two to three hours using a culture medium for preparation of feeder cells (B) containing MMC at a final concentration of 10 µg/mL, followed by the inactivation of cell division. Then, the culture medium for preparation of feeder cells (B) containing MMC was removed, and the cells were washed three times with PBS to produce feeder cells. These feeder cells were plated onto a gelatin-coated dish having a diameter of 60 mm at approximately  $4 \times 10^5$  per dish as the number of living cells and left to adhere.

[0025]

Composition of a culture medium for preparation of feeder cells (B):

A mixed culture medium of DMEM and Ham F in 1 : 1 added with 20 v/v% serum replacement (Knock out Serum Replacement: from Invitrogen (patent document No.1)) containing 83 g/L albumin and 100 mg/L insulin, 1 v/v% solution of MEM non-essential amino acid (from Invitrogen), 1mmol/L sodium pyruvate, 2mmol/L L-glutamine, 0.1 mmol/L 2-mercaptoethanol, 10 µg/L EGF and 1 µg/L FGF

[0026]

After thawing a cryopreserved stock of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey, a suspension of those cells at a concentration of approximately  $2 \times 10^5$  cells/mL as the number of living cells in the following culture medium for embryonic stem cells from a cynomolgus monkey (A) was plated onto the dish in which the feeder cells described above were

left to adhere. The colonies of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C, changing culture media for embryonic stem cells from a cynomolgus monkey (A) everyday until grown enough for subculture (for ten days).

[0027]

Composition of a culture medium for embryonic stem cells from a cynomolgus monkey (A)

A mixed culture medium of DMEM and Ham F in 1 : 1 added with 20 v/v% serum replacement (patent document No.1) containing 83 g/L albumin and 100 mg/L insulin, 1 v/v% MEM non-essential amino acid solution (from Invitrogen), 1mmol/L sodium pyruvate, 2mmol/L L-glutamine and 0.1 mmol/L 2-mercaptoethanol.

[0028]

The colonies of cultured embryonic stem cells from a cynomolgus monkey described above were dissociated from the dish by trypsinization (0.25 w/v% trypsin). A part of the cells in the dish were plated again onto a dish containing new feeder cells, then culture was kept under the same conditions for four days, and the remaining cells in the dish were dissociated therefrom to count.

[0029]

After finishing culture the subcultured colonies of embryonic stem cells, a part of the cells in the dish were dissociated from the dish similar to the above to count. The remaining cells in the dish were fixed with 4 w/v% paraformaldehyde, then immunostained with FITC-labeled SSEA-4 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc), and observed with a 460~490 nm BP and a 515 nm BA by fluorescence

microscopy.

[0030]

As a result, the embryonic stem cells from a cynomolgus monkey had an equivalent colony morphology as that cultured with the feeder cells derived from mouse fetal fibroblasts both during and after subculture (Figs. 1 and 2), showing the embryonic stem cells from a cynomolgus monkey were proliferated (Fig. 3). Further, in immunostaining at the end of culture, a fluorescence by SSEA-4, which is one of markers for embryonic stem cells from a primate, was observed (Fig. 4), proving it to be the colony of embryonic stem cells from a primate.

This result suggested that on feeder layer prepared from MRC-5 by the method according to the present invention, embryonic stem cells can be cultured.

[0031]

(Example 3)

MRC-5 obtained from Cell Bank as in Example 1 was suspended at a cell count of  $2.4 \times 10^5$  cells using the culture medium for preparation of feeder cells (B) and subcultured four passages into 53.68 PDL on a collagen-coated culture dish. Then, the cultured MRC-5 described above was cultured for two to three hours in a culture medium for preparation of feeder cells (B) containing MMC at a final concentration of 10 µg/mL, followed by the inactivation of cell division. Then, the culture medium for preparation of feeder cells (B) containing MMC was removed and the cells were washed three times with PBS, preparation of feeder cells.

[0032]

These feeder cells were plated onto a gelatin-coated dish having a diameter of 60 mm at approximately  $4 \times 10^5$  per dish as the number of living cells and left to adhere. After thawing a cryopreserved stock of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey, a suspension of those cells at a concentration of approximately  $2 \times 10^5$  cells/mL as the number of living cells in the culture medium for embryonic stem cells from a cynomolgus monkey (A) was plated onto the dish in which the feeder cells were left to adhere. The colonies of embryonic stem cells were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C, changing culture media everyday until grown enough for subculture (for ten days). The colonies of embryonic stem cells were dissociated by trypsinization (0.25 w/v% trypsin), and a part of the cells in the dish were plated again onto a dish containing new feeder cells, then culture was kept under the same conditions for four days, and the remaining cells in the dish were dissociated therefrom to count.

[0033]

After finishing culture the subcultured colonies of embryonic stem cells, the cells were dissociated from the dish to count. As a result, the embryonic stem cells from a cynomolgus monkey had an equivalent colony morphology as that cultured with mouse feeder cells both during subculture and at the end of culture (Figs.5 and 6), showing the cells were proliferated (Fig. 7).

This result suggested that using a collagen-coated dish as in Example 2, embryonic stem cells can be cultured with the feeder cells prepared from MRC-5.

[0034]

(Example 4)

MRC-5 obtained from Cell Bank as in Example 1 was suspended at  $2.1 \times 10^5$  cells using a culture medium for preparation of feeder cells (B), then subculture was repeated on a gelatin-coated culture dish until the proliferation was declined, and the proliferation limit with a serum-free medium was examined. As a result, with a culture medium of the present invention, it was confirmed that fibroblasts available for feeder cells can be grown even from 41.77 PDL, subcultured up to four passages, and divided up to approximately 53 PDL (Fig. 8).

This result suggested that a substantial amount of feeder cells can be prepared from a single cell strain.

[0035]

(Example 5)

MRC-5 obtained from Cell Bank as in Example 1 was suspended at  $2.1 \times 10^5$  cells using a culture medium for preparation of feeder cells (B), then subculture was repeated on a collagen-coated culture dish until the proliferation was declined, and the proliferation limit with a serum-free medium was examined.

As a result, with a culture medium of the present invention, it was confirmed that fibroblasts available for feeder cells can be grown even from 41.77 PDL, subcultured up to seven passages, and divided into approximately 60 PDL, which is nearly the limit of the finite cell division of fibroblasts (Fig. 9).

This result suggested that a culture medium of the present invention could produce more feeder cells in combination with a collagen coat.

[0036]

(Example 6)

A normal human diploid lung fibroblast cell line (TIG-3) obtained from Cell Bank and cultured into 28.76 PDL in a medium of 10 v/v% FBS in MEM was suspended at  $1.8 \times 10^5$  cells using a culture medium for preparation of feeder cells (B) and then cultured into 35.51 PDL on a collagen-coated culture dish through two-passages of subculture.

Then, TIG-3 was cultured in a culture medium for preparation of feeder cells (B) containing MMC at a final concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for two to three hours, followed by the inactivation of cell division. Then, the culture medium containing MMC was removed and the cells were washed three times with PBS. The cells after washing were dissociated from the culture dish by trypsinization (0.25 w/v% trypsin, 1 mM EDTA) to count. As a result, approximately  $2.1 \times 10^7$  of feeder cells were obtained.

This result suggested that a large amount of feeder cells could be prepared from a fibroblast cell line other than MRC-5 by using a culture medium of the present invention.

[0037]

(Comparative Example 1)

MRC-5 obtained from Cell Bank as in Example 1 was suspended at  $2.2 \times 10^5$  cells using a culture medium for human primary fibroblasts which was a modified MCDB 202 free of serum albumin and added with 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  FGF and 5 mg/L insulin (hereinafter referred to as "FGM": from Cambrex) and cultured on a gelatin-coated culture dish through

one-passage of subculture. However, the cell proliferation was inactivated after subculture, thereby the required MMC treatment was not conducted, resulting in difficulties in preparation of feeder cells.

[0038]

(Comparative Example 2)

MRC-5 obtained from Cell Bank as in Example 1 was suspended at  $2.2 \times 10^3$  cells using FGM and cultured on a collagen-coated culture dish through one-passage of subculture. However, similarly to Comparative Example 1, the cell proliferation was inactivated after subculture, thereby the required MMC treatment was not conducted, resulting in difficulties in preparation of feeder cells.

[Industrial Applicability]

[0039]

According to the present invention, feeder cells used in culture of embryonic stem cells including human's can be prepared with a serum-free medium with a reduced risk of zoonosis. Further, in combination with a cell adhesion factor such as gelatin and collagen, a long-term culture can be achieved, so that limited donor-derived materials can be used ultimately, resulting in considerably minimizing the risk of contamination of contagium which is caused by changing donors of feeder cells. In addition, as the present invention was confirmed to be available for a plurality of cell lines by Examples, it can be used in the preparation of respective feeder cells appropriate for embryonic stem cells derived from a variety of animals.

[Brief Description of the Drawings]

[0040]

[Figure 1] This figure shows 10 day-old colony (x 40) of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey, which were cultured on feeder layer prepared in Example 2.

[Figure 2] This figure shows 4 day-old colony (x 100) of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey after subcultured, which were cultured on feeder layer prepared in Example 2.

[Figure 3] This figure shows the proliferation of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey, which were cultured on feeder layer prepared in Example 2.

[Figure 4] This figure shows an immunostained image (x 100) with SSEA-4 of 4 day-old colony of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey after subcultured, which were cultured on feeder layer prepared in Example 2.

[Figure 5] This figure shows 10 day-old colony (x 40) of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey, which were cultured on feeder layer prepared in Example 3.

[Figure 6] This figure shows 4 day-old colony (x 100) of embryonic stem cells from a cynomolgus s monkey after subcultured, which were cultured on feeder layer prepared in Example 3.

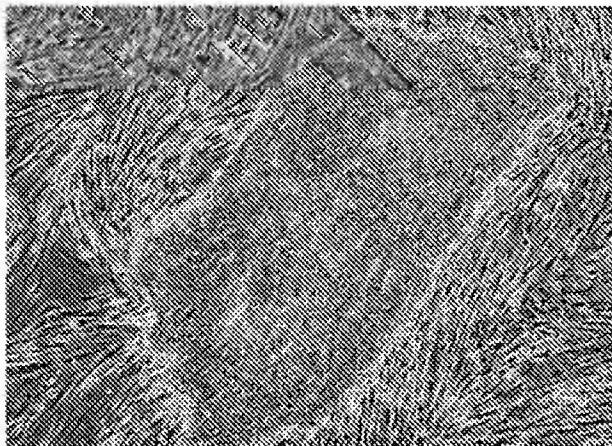
[Figure 7] This figure shows the proliferation of embryonic stem cells from a cynomolgus monkey, which were cultured on feeder layer prepared in Example 3.

[Figure 8] This figure shows the proliferation of MRC-5 cultured using a gelatin coat in combination with a culture medium for preparation of feeder cells (B) in Example 4. The starting PDL of culture and the ending one which was calculated by counting cells at following subculture, were illustrated.

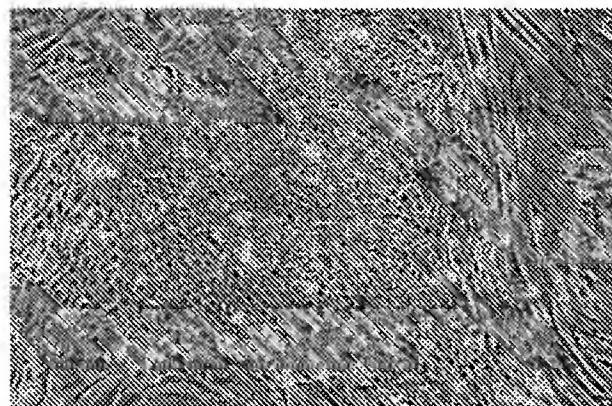
[Figure 9] This figure shows the proliferation of MRC-5 cultured using a collagen coat in combination with a culture medium for preparation of feeder cells (B) in Example 5. The starting PDL of culture and the ending one which was calculated by counting cells at following subculture, were illustrated.

[Document] Drawings

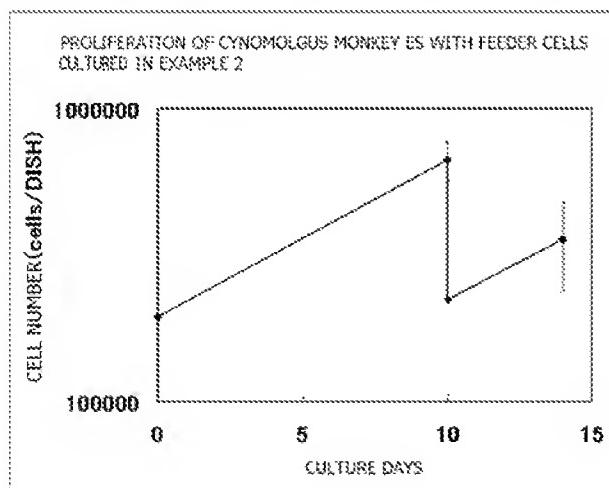
[Fig. 1]



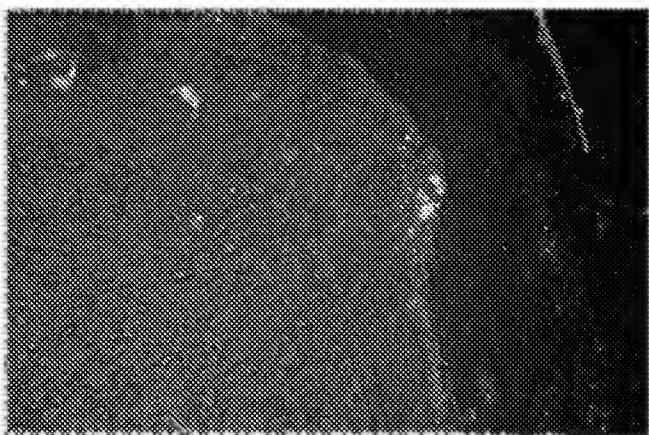
[Fig. 2]



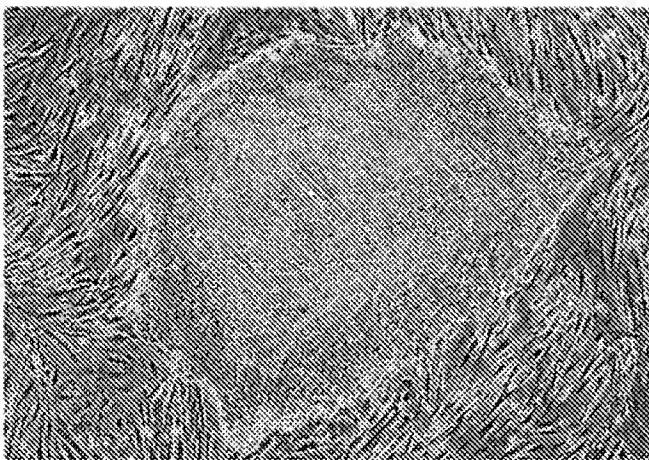
[Fig. 3]



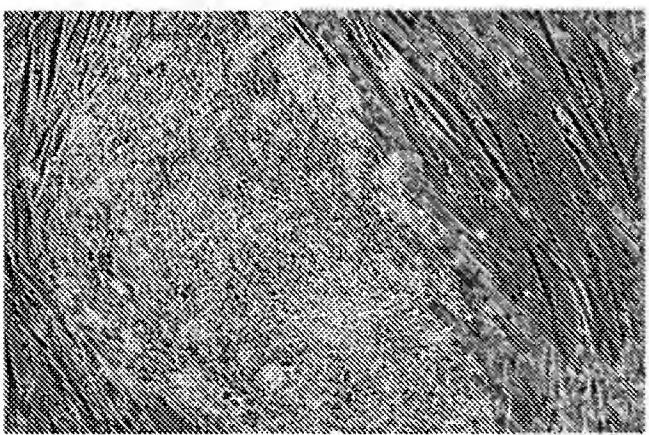
[Fig. 4]



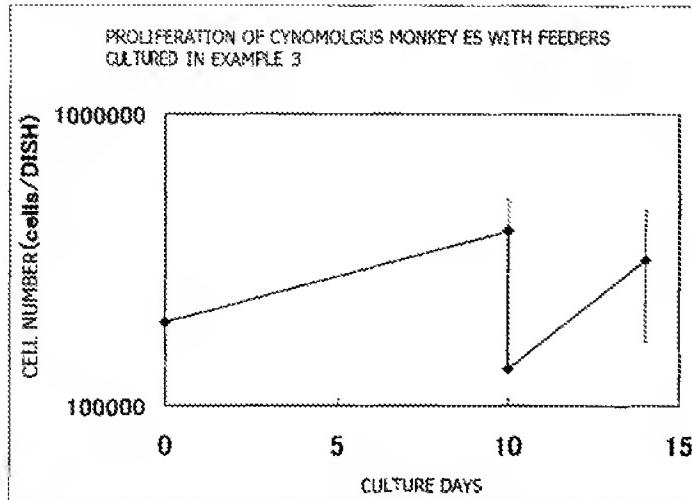
[Fig. 5]



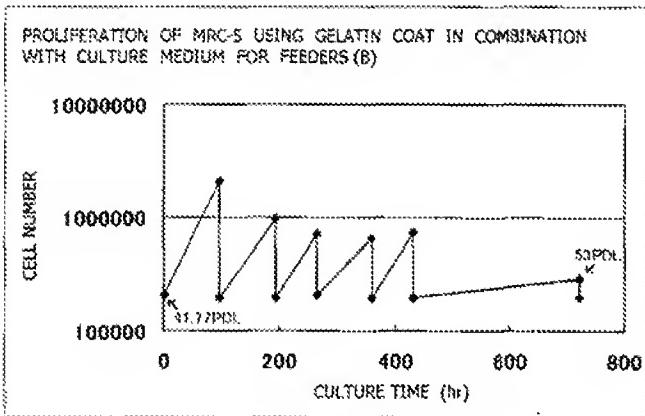
[Fig. 6]



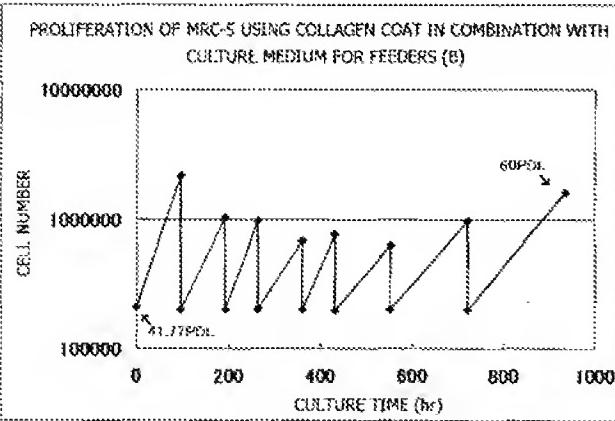
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Document] Abstract

[Problem] A culture medium for preparation of feeder cells for embryonic stem cells, which can efficiently establish feeder cells for use in culture of embryonic stem cells including human's from limited donor-derived materials and culture them in a condition of a reduced risk of infection, is provided. Further, a preparation method of feeder cells, which is relatively safe even when subjected to coculture with embryonic stem cells including human's, and the resulting feeder cells therefrom are provided.

[Means for solving the Problems] With the culture medium for preparation of feeder cells for embryonic stem cells comprising at least a serum albumin and insulin in a basal medium, a cell population comprising at least one kind of cells selected from fetal skin fibroblasts, fetal myofibroblasts, fetal lung fibroblasts, fetal epithelial cells, fetal endothelial cells, adult skin fibroblasts, adult lung fibroblasts, adult epithelial cells and endothelial cells which can become feeder cells for embryonic stem cells can be stably proliferated.

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 4-1009715  
 【あて先】 特許庁長官殿  
 【国際特許分類】 C12N 5/06  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 京都府京都市左京区岩倉西河原町273-7  
   【氏名】 中辻 憲夫  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 京都市左京区聖護院川原町4-14 イーグルコート聖護院40  
   【氏名】 末盛 博文  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 千葉県船橋市行田1丁目50番1号 旭テクノグラス株式会社内  
   【氏名】 浅香 勲  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 千葉県船橋市行田1丁目50番1号 旭テクノグラス株式会社内  
   【氏名】 菅井 晴美  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 千葉県船橋市行田1丁目50番1号 旭テクノグラス株式会社内  
   【氏名】 関本 玲子  
 【特許出願人】  
   【識別番号】 501373049  
   【氏名又は名称】 中辻 憲夫  
 【特許出願人】  
   【住所又は居所】 京都市左京区聖護院川原町4-14 イーグルコート聖護院40  
   【氏名又は名称】 末盛 博文  
 【特許出願人】  
   【識別番号】 000158208  
   【氏名又は名称】 旭テクノグラス株式会社  
 【特許出願人】  
   【識別番号】 000002956  
   【氏名又は名称】 田辺製薬株式会社  
 【代理人】  
   【識別番号】 100088904  
   【弁理士】  
   【氏名又は名称】 庄司 隆  
 【選任した代理人】  
   【識別番号】 100124453  
   【弁理士】  
   【氏名又は名称】 資延 由利子  
 【選任した代理人】  
   【識別番号】 100129160  
   【弁理士】  
   【氏名又は名称】 古館 久丹子  
 【手数料の表示】  
   【予納台帳番号】 067070  
   【納付金額】 21,000円  
 【提出物件の目録】  
   【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

血清アルブミン、インスリンおよび基本培地を含み、当該血清アルブミンの量が2 g/L～50 g/L、当該インスリンの量が1 mg/L～100 mg/Lであり、当該基本培地がMEM、 $\alpha$ -MEM、DMEM、IMDM、Ham F10、Ham F12、Medium199、RPMI1640、RTTC 80-7、MCDB104、MCDB105、MCDB153、MCDB201およびMCDB202から選択される少なくとも1種からなる、胚性幹細胞用フィーダー細胞作成培地。

【請求項 2】

さらに細胞接着因子が含有されている、請求項1に記載の培地。

【請求項 3】

細胞接着因子が、コラーゲン、ゼラチン、ファイプロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ポリリジン、ポリオルニチンおよびポリエチレンイミンから選択される少なくとも1種類である、請求項2に記載の培地。

【請求項 4】

さらに細胞増殖因子が含有されている、請求項1、2または3に記載の培地。

【請求項 5】

細胞増殖因子が、線維芽細胞増殖因子および上皮細胞増殖因子から選択される少なくとも1種類である、請求項4に記載の培地。

【請求項 6】

胎児表皮線維芽細胞、胎児筋線維芽細胞、胎児肺線維芽細胞、胎児上皮細胞、胎児内皮細胞、成体表皮線維芽細胞、成体肺線維芽細胞、成体上皮細胞および成体内皮細胞から選択される少なくとも1種の細胞種を含む細胞集団を請求項1～5のいずれか一項に記載の胚性幹細胞用フィーダー細胞作成培地中で培養増殖させる工程と、当該培養増殖された細胞集団をマイトイシンCまたは放射線照射により増殖停止させる工程とを含む、胚性幹細胞用フィーダー細胞の製造方法。

【請求項 7】

前記培養増殖工程を細胞接着因子をコートした培養容器中で行う、請求項6に記載の製造方法。

【請求項 8】

細胞接着因子が、コラーゲン、ゼラチン、ファイプロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ポリリジン、ポリオルニチンおよびポリエチレンイミンから選択される少なくとも1種類である、請求項7に記載の製造方法。

【請求項 9】

前記培養増殖工程において培養細胞を平均して20回以上細胞分裂させる、請求項6、7または8に記載の製造方法。

【請求項 10】

請求項6～9のいずれか一項に記載の製造方法で得られた胚性幹細胞用フィーダー細胞。

【書類名】明細書

【発明の名称】胚性幹細胞用フィーダー細胞作成培地およびフィーダー細胞

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト胚性幹細胞を含めた胚性幹細胞の培養に利用されるフィーダー細胞を作成するための培地、その培地を利用したフィーダー細胞の製造方法、および、それによつて得られる胚性幹細胞用フィーダー細胞に関するものである。

【背景技術】

【0002】

胚性幹細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来する未分化細胞であり、全組織への分化が可能な多様性を有しており、細胞培養、組織移植、創薬研究、および遺伝子治療の分野での応用を期待されている。さらに、成体の体細胞核を移植して得られるクローン胚から胚性幹細胞が誘導されることも知られている。近年、胚性幹細胞を神経組織をはじめとする様々な組織へ誘導する技術が報告されており、胚性幹細胞から誘導される組織は免疫排除がない遺伝的に同等な組織であることより、移植医療や遺伝子治療への利用が期待されるようになつた。また、胚性幹細胞の作成の対象は実験小動物からヒトを含めた靈長類に拡げられており、アカゲザル胚性幹細胞の単離、ヒト体外受精卵からの胚性幹細胞の分離などが報告されている。

【0003】

また、末盛らは、前臨床試験に有用な、医学研究に広く用いられているカニクイザルの顯微受精卵から、新たに胚性幹細胞を作成することに成功し、その多能性が長期にわたつて維持されることを証明し、さらに、このカニクイザル胚性幹細胞からはドーパミン神経が誘導可能であることも証明した。

【0004】

上記のようなヒト胚性幹細胞を含む胚性幹細胞は、その成長を促進するため、従来フィーダー細胞と共に培養されていた。特にヒトを含む靈長類の胚性幹細胞は血清を使用して培養すると未分化状態を維持できないことより、無血清培地による培養が検討されている（特許文献1参照）。

【0005】

しかし、無血清培地による培養だけでは胚性幹細胞を維持できず、血清の効果の一部を代替するために、フィーダー細胞との共培養が必須となっていた。このフィーダー細胞としては、たとえば、マウスの胎児より調製された線維芽細胞をマイトイシンCや放射線照射によって増殖停止させた細胞が使用されていたため、ヒト胚性幹細胞とマウス由來のフィーダー細胞との共培養は人獣共通感染症等のおそれがあった。このヒト胚性幹細胞から誘導される組織は移植医療や遺伝子治療の材料として期待されるため、人獣共通感染症等のおそれは可能な限り排除するのが望ましい。

【0006】

そこで、マウスの胎児の代わりにヒト胎児の線維芽細胞、成人輸卵管上皮細胞（非特許文献1）や、ヒト新生児の包皮由來線維芽細胞（非特許文献2、3）、成人表皮線維芽細胞（非特許文献4）、ヒト骨髄細胞（非特許文献5）をフィーダー細胞として利用する方法が報告されている。

【0007】

しかし、これらのほとんどは初代細胞を利用するものであり、ヒト胚性幹細胞を大量に得るために複数のドナー由來の材料が必要となるため、ドナー毎に感染源のチェックが必要となり手間がかかる。また、これらのヒト由來のフィーダー細胞を作成するための培地はウシ胎児血清（FBS）等の血清が使用されており、この血清からも未知の感染症やブリオン等による未知の病原体が伝播される危険性がある。

【特許文献1】国際公開第98/30679号パンフレット

【非特許文献1】Nat. Biotechnol. 20:933-936(2002)

【非特許文献2】Biol. Reprod. 68:2150-2156(2003)

【非特許文献3】Hum. Reprod. 18:1404-1409(2003)

【非特許文献4】Stem Cells. 21:546-556(2003)

【非特許文献5】Stem Cells. 21:131-142(2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、ヒト胚性幹細胞を含めた胚性幹細胞の培養に用いられるフィーダー細胞を、限られたドナー由来の材料から効率的に樹立し、感染のおそれの少ない状態で培養しうる、胚性幹細胞用フィーダー細胞作成培地（以下、「フィーダー細胞作成培地」という）を提供することである。さらに、胚性幹細胞と共に培養しても比較的安全なフィーダー細胞の製造方法、および、それによって得られるフィーダー細胞を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、前述の課題を解決すべく研究を進めた結果、基本培地に少なくとも血清アルブミンおよびインスリンを含むフィーダー細胞作成培地により、胚性幹細胞のフィーダー細胞と成り得る胎児表皮線維芽細胞、胎児筋線維芽細胞、胎児肺線維芽細胞、胎児上皮細胞、胎児内皮細胞、成体表皮線維芽細胞、成体肺線維芽細胞、成体上皮細胞、成体内皮細胞から選択される少なくとも1種の細胞種を含む細胞集団を安定に増殖できることを見出し、本発明を完成した。

【0010】

すなわち本発明は、以下よりなる。

1. 血清アルブミン、インスリンおよび基本培地を含み、当該血清アルブミンの量が2g/L～50g/L、当該インスリンの量が1mg/L～100mg/Lであり、当該基本培地がMEM、 $\alpha$ -MEM、DMEM、IMDM、Ham F10、Ham F12、Medium199、RPMI1640、RTTC 80-7、MCDB104、MCDB105、MCDB153、MCDB201およびMCDB202から選択される少なくとも1種からなる、胚性幹細胞用フィーダー細胞作成培地。
2. さらに細胞接着因子が含有されている、前項1に記載の培地。
3. 細胞接着因子が、コラーゲン、ゼラチン、ファイプロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ポリリジン、ポリオルニチンおよびポリエチレンイミンから選択される少なくとも1種類である、前項2に記載の培地。
4. さらに細胞増殖因子が含有されている、前項1、2または3に記載の培地。
5. 細胞増殖因子が、線維芽細胞増殖因子および上皮細胞増殖因子から選択される少なくとも1種類である、前項4に記載の培地。
6. 胎児表皮線維芽細胞、胎児筋線維芽細胞、胎児肺線維芽細胞、胎児上皮細胞、胎児内皮細胞、成体表皮線維芽細胞、成体肺線維芽細胞、成体上皮細胞および成体内皮細胞から選択される少なくとも1種の細胞種を含む細胞集団を前項1～5のいずれか一項に記載の胚性幹細胞用フィーダー細胞作成培地中で培養増殖させる工程と、当該培養増殖された細胞集団をマイトイシンCまたは放射線照射により増殖停止させる工程とを含む、胚性幹細胞用フィーダー細胞の製造方法。
7. 前記培養増殖工程を細胞接着因子をコートした培養容器中で行う、前項6に記載の製造方法。
8. 細胞接着因子が、コラーゲン、ゼラチン、ファイプロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ポリリジン、ポリオルニチンおよびポリエチレンイミンから選択される少なくとも1種類である、前項7に記載の製造方法。
9. 前記培養増殖工程において培養細胞を平均して20回以上細胞分裂させる、前項6、7または8に記載の製造方法。
10. 前項6～9のいずれか一項に記載の製造方法で得られた胚性幹細胞用フィーダー細胞。

【発明の効果】

【0011】

本発明のフィーダー細胞作成培地により、ヒト胚性幹細胞を含めた胚性幹細胞と共培養しても比較的安全なフィーダー細胞を樹立することができ、長期の培養が可能となる。フィーダー細胞の材料は、例えば胎児表皮線維芽細胞、胎児筋線維芽細胞、胎児肺線維芽細胞、胎児上皮細胞、胎児内皮細胞、成体表皮線維芽細胞、成体肺線維芽細胞、成体上皮細胞、成体内皮細胞等の限られたドナー由来であるため、長期の培養が可能となることは有用である。これにより、ヒト胚性幹細胞を含めた胚性幹細胞と胚性幹細胞用フィーダー細胞を共培養することができ、移植や遺伝子治療等の材料として胚性幹細胞を使用する際に、人畜共通感染症等のおそれがない胚性幹細胞を提供することができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0012】

本発明で用いられる基本培地としてはMEM、 $\alpha$ -MEM、DMEM、IMDM、Ham F10、Ham F12、Medium199、RPMI1640、RTIC 80-7、MCDB104、MCDB105、MCDB153、MCDB201、MCDB202の何れか単独および／または、複数の組み合わせが可能であるが、線維芽細胞の無血清培地に利用されうるDMEM、IMDM、Ham F10、Ham F12、RTIC 80-7、MCDB104、MCDB105、MCDB201、MCDB202が好ましく、靈長類胚性幹細胞の無血清培養にも利用され得るDMEMとHam F12の1:1の混合培地が培地の栄養価や、フィーダー細胞作成後の胚性幹細胞との共培養での生存率の面からより好適である。

なお、本発明に利用される基本培地の詳細な組成は、表1に記載された出典に基づく。

##### 【表1】

表1 基本培地の出典

基本培地	出典
MEM、 $\alpha$ -MEM、DMEM、IMDM、RPMI1640	日本組織培養学会編「組織培養の技術」[第3版]応用編1996年 551-553
Medium 199、MCDB 104、MCDB 153	日本生化学会編「新実験化学講座18 細胞培養技術」1990年 27-29
Ham F10、Ham F12、MCDB 105、MCDB 202	Katsuta H. ed. "Nutritional Requirements of Cultured Cells" 1978 59-115
MCDB 201	Makseehan, W. L. and Ham, R. G. 1976 J. Cell Biol. 71 727-734
RTIC 80-7	Yamane I et al. 1981 Exp. Cell Res. 134 470-474

##### 【0013】

本発明で用いられるフィーダー細胞作成培地は、血清アルブミンおよびインスリンを必須成分として含有する。この培地にはさらに他の成分を含んでいてもよい。ただし、他の成分としてウシ胎児血清(FBS)などの未知の成分や夾雜物を含み、感染症等のおそれが高いものは不適当である。

##### 【0014】

他の成分としては、前記基本培地に含まれていないものまたは前記基本培地には含まれているがその量が十分でない成分などがある。具体的には、例えば、細胞接着因子、細胞増殖因子、トランスフェリンなどの金属含有タンパク質、その他のポリペプチドやタンパク質、アミノ酸類、ビタミン類などがある。これら成分を基本培地に配合してフィーダー細胞作成培地が製造される。また、市販されている血清代替物と称されているものなどを前記基本培地に配合して、フィーダー細胞作成培地を製造することもできる。この血清代替物は、通常血清アルブミンやインスリンを含有し、さらに上記のような他の成分を含有する。したがって、基本培地に血清代替物を血清アルブミンおよびインスリンが目的の量となる量を配合して使用することができる。血清代替物としては、例えば、前記特許文献1に記載の血清代替物がある。

##### 【0015】

本発明におけるフィーダー細胞作成培地には、上記その他の成分として細胞接着因子が含有されていることが好ましい。また、細胞増殖因子が含有されていることが好ましい。さらに、トランスフェリンなどの金属含有タンパク質が含有されていることが好ましい。

細胞接着因子としては、コラーゲン、ゼラチン、ファイプロネクチン、ピトロネクチン、ラミニン、ボリリジン、ポリオルニチンおよびポリエチレンイミンから選択される少なくとも1種類であることが好ましく、特に、コラーゲン、ゼラチン、ファイプロネクチン、ピトロネクチンなどが好ましい。細胞増殖因子としては、線維芽細胞増殖因子(FGF)および上皮細胞増殖因子(EGF)から選択される少なくとも1種類であることが好ましい。

#### 【0016】

本発明におけるフィーダー細胞作成培地は、血清アルブミンを2g/L～50g/Lおよびインスリンを1mg/L～100mg/Lの割合で含有することを必須とする。より好ましい血清アルブミンの量は4g/L～25g/Lであり、インスリンの量は5mg/L～30mg/Lである。

#### 【0017】

さらに、細胞接着因子は0.3mg/L～50mg/L程度含有されていることが好ましい。ただし後述のように細胞接着因子を培養容器内面にコートして使用する場合は、フィーダー細胞作成培地中には細胞接着因子を配合する必要はない。細胞増殖因子はフィーダー細胞作成培地中に0.01μg/L～100μg/Lの割合で含有されていることが好ましく、特に線維芽細胞増殖因子は0.1μg/L～10μg/L含有されていることが好ましく、上皮細胞増殖因子は0.5μg/L～50μg/L含有されていることが好ましい。トランスフェリンなどの金属含有タンパク質は1mg/L～50mg/Lの割合で含有されていることが好ましい。

#### 【0018】

本発明の胚性幹細胞用フィーダー細胞樹立のために使用可能な細胞として、例えば胎児表皮線維芽細胞、胎児筋線維芽細胞、胎児肺線維芽細胞、胎児上皮細胞、胎児内皮細胞、成体表皮線維芽細胞、成体肺線維芽細胞、成体上皮細胞、成体内皮細胞から少なくとも1種の細胞種を選択することができる。選択された細胞種を含む細胞集団を、本発明のフィーダー細胞作成培地を含む培養容器内において、3%～10%のCO<sub>2</sub>、温度35℃～40℃の条件下で1日～30日培養し、増殖させることができる。上記細胞集団を増殖させた後、細胞の増殖をマイトイシンCまたは放射線照射により停止させることで、フィーダー細胞を大量に得ることができる。

#### 【0019】

以上のように、細胞増殖させる工程と、増殖停止させる工程を含む製造方法により、無血清培養下で育成され、動物由来感染が殆どない安全な胚性幹細胞用フィーダー細胞を製造することができる。前記細胞増殖工程では、細胞の培養容器に、予め細胞接着因子をコートしておくことができる。当該細胞増殖工程において、培養細胞を平均して20回以上細胞分裂させることで、フィーダー細胞を大量に製造することができる。

#### 【実施例】

##### 【0020】

以下に、本発明の実施例と比較例について説明するが、本実施例は本発明の再現を補助する目的でその一実施態様を示すものであって、本実施例から本発明の限界や制限事項は示唆されない。なお、以下の実施例等においては、フィーダー細胞として、ウシ胎児血清(FBS)を含む培地で増殖された株化ヒト細胞を使用した。これは、人体から直接得たヒト細胞は実験材料としての入手が困難であることより、既に研究用に提供されている株化ヒト細胞を入手して実験に使用せざるを得ないことによる。

##### 【0021】

###### (実施例1)

FBSを10v/v%添加したMEM培地で、41.77PDL (population doubling Level:通算細胞集団倍加値(日本組織培養学会編「組織培養の技術第三版(基礎編)1996年 p42))まで培養した、細胞バンクより分譲されたヒト正常2倍体肺線維芽細胞株(MRC-5)を、以下のフィーダー細胞作成培地(A)を用いて細胞数が $2.4 \times 10^6$ cellsとなるように懸濁し、ゼラチンコートしたシャーレ上で1回の継代培養を挟んで42.99PDLまで培養した。

**【0022】**

フィーダー細胞作成培地（A）組成：

ウシ血清アルブミン(BSA) 5g/L, EGF 10 μg/L, インスリン 1mg/L, ハイドロコルチゾン 1mg/Lが添加されたRITC80-7培地

**【0023】**

ついで、前記培養した該MRC-5を、最終濃度10 μg/mlのマイトマイシンC (MMC) を含むフィーダー細胞作成培地（A）を用いて2～3時間培養し、細胞分裂を不活性化させた。その後、MMCを含むフィーダー細胞作成培地（A）を除き、細胞をリン酸緩衝溶液（PBS）で3回洗浄した。洗浄後の細胞を、トリプシン処理（0.25w/v%トリプシン、1 mM EDTA）により培養シャーレから剥がし、細胞数をカウントした。その結果、約 $5.5 \times 10^6$ cellsのフィーダー細胞を得ることができた。

**【0024】**

(実施例2)

実施例1と同様の細胞バンクより分譲されたMRC-5を、以下のフィーダー細胞作成培地（B）を用いて細胞数が $2.1 \times 10^6$ cellsとなるように懸濁し、ゼラチンコートした培養シャーレ上で、4回の継代培養を行い53.47PDLまで培養した。

ついで、前記培養したMRC-5を最終濃度10 μg/mlのMMCを含むフィーダー細胞作成培地（B）を用いて2～3時間培養し、細胞分裂を不活性化させた。その後、MMCを含むフィーダー細胞作成培地（B）を除き、PBSで細胞を3回洗浄しフィーダー細胞を作成した。このフィーダー細胞を、ゼラチンコートした直径6.0mmのシャーレに1枚あたりに生細胞数として約 $4 \times 10^5$ 個播き静着させた。

**【0025】**

フィーダー細胞作成培地（B）組成：

アルブミン83g/Lおよびインスリン100mg/Lを含む血清代替物（Knock out Serum Replacement:インビトロジェン社（特許文献1））20v/v%，MEM非必須アミノ酸溶液（インビトロジェン社）1v/v%、ビルビン酸Na 1mmol/L、L-グルタミン 2mmol/L、2-メルカプトエタノール 0.1 mmol/L、EGF 10 μg/L、FGF 1 μg/Lが添加されたDMEM:Ham F=1:1の混合培地

**【0026】**

凍結保存したカニクイザル胚性幹細胞を解凍後、以下のカニクイザル胚性幹細胞用培地（A）に生細胞数として約 $2 \times 10^5$ cells/mlの濃度となるように懸濁したものを、前記フィーダー細胞が静着したシャーレに播き込んだ。5%CO<sub>2</sub>、37℃のインキュベーター内で、カニクイザル胚性幹細胞のコロニーが成長し継代培養が可能となるまで（10日間）、毎日カニクイザル胚性幹細胞用培地（A）の交換を行いながら培養した。

**【0027】**

カニクイザル胚性幹細胞用培地（A）組成：

アルブミン83g/Lおよびインスリン100mg/Lを含む血清代替物（特許文献1）20v/v%，MEM非必須アミノ酸溶液（インビトロジェン社）1v/v%、ビルビン酸Na 1mmol/L、L-グルタミン 2mmol/L、2-メルカプトエタノール 0.1 mmol/Lが添加されたDMEM:Ham F=1:1の混合培地

**【0028】**

前記培養されたカニクイザル胚性幹細胞コロニーを、トリプシン処理（0.25w/v%トリプシン）によりシャーレから解離させた。一部のシャーレ中の細胞は新しいフィーダー細胞を含むシャーレに再び播き込まれ、その後同条件で4日間培養を続け、残りのシャーレ中の細胞をシャーレから剥がし、細胞数をカウントした。

**【0029】**

継代した胚性幹細胞コロニーを培養終了後、一部のシャーレ中の細胞を上記と同様にシャーレから剥がし、細胞数をカウントした。残りのシャーレ中の細胞は、4 w/v%パラホルムアルデヒドで固定した後、FITCラベルしたSSEA-4抗体（サンタクルズ社）で免疫染色し、蛍光顕微鏡でBP460~490nm、BA515nmにより観察した。

**【0030】**

その結果カニクイザル胚性幹細胞コロニーの形態は、継代時および培養終了時のいずれにおいてもマウス胎児線維芽細胞由来のフィーダー細胞で培養されたものと同等であり（図1、図2）、カニクイザル胚性幹細胞は増殖していた（図3）。また、培養終了時の免疫染色において、靈長類胚性幹細胞のマーカーの一つであるSSEA-4による蛍光が観察されることから（図4）、靈長類胚性幹細胞のコロニーであることが証明された。

このことから、本発明による方法で作成されたMRC-5からのフィーダー細胞により、胚性幹細胞の培養が可能であることが示唆された。

#### 【0031】

##### (実施例3)

実施例1と同様の細胞バンクより分譲されたMRC-5を、フィーダー細胞作成培地（B）を用いて細胞数が $2.4 \times 10^6$ cellsとなるように懸濁し、コラーゲンコートした培養シャーレ上で4回の継代培養を行い53.68PDLまで培養した。ついで、前記培養したMRC-5を、最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のMMCを含むフィーダー細胞作成培地（B）で2~3時間培養し、細胞分裂を不活性化した。その後、MMCを含むフィーダー細胞作成培地（B）を除き、PBSで細胞を3回洗浄し、フィーダー細胞を作成した。

#### 【0032】

このフィーダー細胞を、ゼラチンコートした直径6.0mmシャーレ1枚あたりに生細胞数として約 $4 \times 10^5$ 個播き静着させた。このフィーダー細胞が静着したシャーレに、凍結保存したカニクイザル胚性幹細胞を解凍後、カニクイザル胚性幹細胞用培地（A）に生細胞数として約 $2 \times 10^6$ cells/mlの濃度で懸濁し播き込んだ。5%CO<sub>2</sub>、37℃のインキュベーター内で、胚性幹細胞のコロニーが成長し継代培養が可能となるまで（10日間）、毎日培地交換を行いながら培養した。トリプシン処理（0.25w/v%トリプシン）により、胚性幹細胞コロニーを解離し、一部のシャーレ中の細胞は新しいフィーダー細胞を含むシャーレに再び播き込み、その後同条件で4日間培養を続け、残りのシャーレ中の細胞をシャーレから剥がし、細胞数をカウントした。

#### 【0033】

継代した胚性幹細胞コロニーの培養終了後、細胞をシャーレから剥がし、細胞数をカウントした。その結果カニクイザル胚性幹細胞コロニーの形態は継代時および培養終了時のいずれにおいてもマウスフィーダー細胞で培養されたものと同等であり（図5、図6）、細胞は増殖していた（図7）。

このことから実施例2と同様、コラーゲンコートしたシャーレを用いると、MRC-5から作成されたフィーダー細胞により、胚性幹細胞の培養が可能であることが示唆された。

#### 【0034】

##### (実施例4)

実施例1と同様の細胞バンクより分譲されたMRC-5を、フィーダー細胞作成培地（B）を用いて $2.1 \times 10^5$ cellsとなるように懸濁し、ゼラチンコートした培養シャーレ上で増殖が悪くなるまで継代培養を繰り返し、無血清培養による増殖限界を調べた。その結果、本発明の培地によりフィーダー細胞となりうる線維芽細胞は41.77PDLからでも4回の継代まで増殖が可能であり、約53PDLまで分裂できることが確認された（図8）。

このことから、1種の細胞株から相当量のフィーダー細胞を作成することが可能であることが示唆された。

#### 【0035】

##### (実施例5)

実施例1と同様の細胞バンクより分譲されたMRC-5を、フィーダー細胞作成培地（B）を用いて $2.1 \times 10^5$ cellsとなるように懸濁し、コラーゲンコートした培養シャーレ上で増殖が悪くなるまで継代培養を繰り返し、無血清培養による増殖限界を調べた。

その結果、本発明の培地によりフィーダー細胞と成り得る線維芽細胞は41.77PDLからでも7回の継代まで増殖が可能であり、線維芽細胞を有限分裂細胞の限界に近い約60PDLまで分裂できることが確認された（図9）。

このことから、本発明の培地はコラーゲンコートと組み合わせることにより、より多くのフィーダー細胞を作成することが可能であることが示唆された。

#### 【0036】

##### (実施例6)

FBSを10v/v%添加したMEM培地で28.76PDLまで培養した細胞バンクより分譲されたヒト正常2倍体肺線維芽細胞株（TIG-3）を、フィーダー細胞作成培地（B）を用いて $1.8 \times 10^5$ cellsとなるように懸濁し、コラーゲンコートした培養シャーレ上で2回の継代培養を挟んで35.51PDLまで培養した。

ついで、最終濃度 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ のMMCを含むフィーダー細胞作成培地（B）でTIG-3を2~3時間培養し、細胞分裂を不活性化した。その後、MMCを含む培地を除き、細胞をPBSで3回洗浄した。トリプシン処理（0.25w/v%トリプシン、1 mM EDTA）により、洗浄後の細胞を培養シャーレから剥がし、細胞数をカウントした。その結果約 $2.1 \times 10^7$ cellsのフィーダー細胞を得ることができた。

このことから、MRC-5以外の線維芽細胞株でも本発明の培地により大量のフィーダー細胞の作成が可能であることが示唆された。

#### 【0037】

##### (比較例1)

実施例1と同様の細胞バンクより分譲されたMRC-5を、FGF $1 \mu\text{g}/\text{L}$ 、インスリン $5 \text{mg}/\text{L}$ が添加され、血清アルブミンを含まないMCDB202を改変したヒト初代線維芽細胞用培地（以下「FGM」という：Cambrex社）を用いて $2.2 \times 10^5$ cellsとなるように懸濁し、ゼラチンコートした培養シャーレ上で1回の継代培養を挟んで培養した。しかし継代後に細胞の増殖は停止し、MMC処理することはできず、フィーダー細胞の作成は困難であった。

#### 【0038】

##### (比較例2)

実施例1と同様の細胞バンクより分譲されたMRC-5を、FGMを用いて $2.2 \times 10^5$ cellsとなるように懸濁し、コラーゲンコートした培養シャーレ上で1回の継代培養を挟んで培養した。しかし比較例1と同様、継代後細胞の増殖は停止し、MMC処理することはできずフィーダー細胞の作成は困難であった。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0039】

本発明によれば、ヒト胚性幹細胞を含めた胚性幹細胞の培養に用いられるフィーダー細胞を動物由来の感染のおそれが少ない無血清培地で生産することができる。また、ゼラチンやコラーゲン等の細胞接着因子と組み合わせることにより、長時間の培養が可能となるため、限られたドナー由来の材料を極限まで利用することが可能となり、フィーダー細胞のドナー変更による感染源混入の危険も非常に低くなる。また、実施例によって本発明は複数の株細胞で利用可能であることが確認されたことから、多種類の動物由来の胚性幹細胞に適したそれぞれのフィーダー細胞の作成にも利用されうる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0040】

【図1】実施例2で作成されたフィーダー細胞によって培養されたカニクイザル胚性幹細胞の10日目のコロニー(40倍)を示す図である。

【図2】実施例2で作成されたフィーダー細胞によって培養されたカニクイザル胚性幹細胞の継代後4日目のコロニー(100倍)を示す図である。

【図3】実施例2で作成されたフィーダー細胞によって培養されたカニクイザル胚性幹細胞の増殖を示す図である。

【図4】実施例2で作成されたフィーダー細胞によって培養されたカニクイザル胚性幹細胞の継代後4日目のコロニーのSSEA-4による免疫染色像(100倍)を示す図である。

【図5】実施例3で作成されたフィーダー細胞によって培養されたカニクイザル胚性幹細胞の増殖を示す図である。

幹細胞の10日目のコロニー(40倍)を示す図である。

【図6】実施例3で作成されたフィーダー細胞によって培養されたカニクイザル胚性幹細胞の継代後4日目のコロニー(100倍)を示す図である。

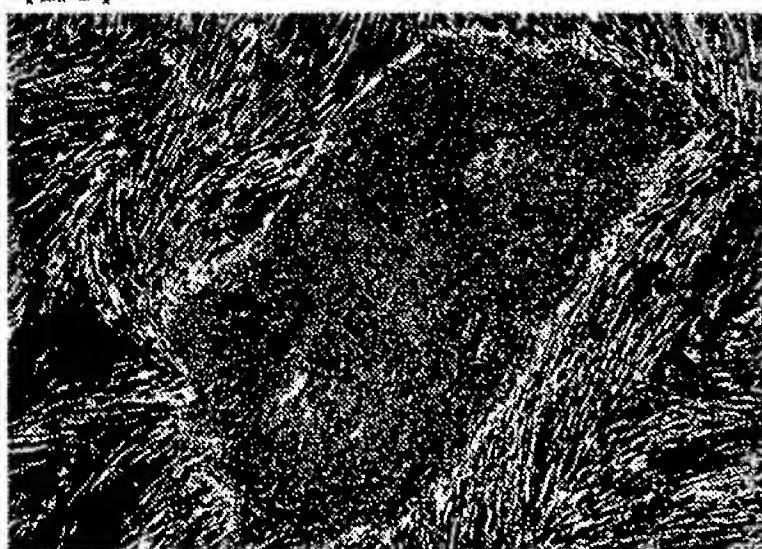
【図7】実施例3で作成されたフィーダー細胞によって培養されたカニクイザル胚性幹細胞の増殖を示す図である。

【図8】実施例4においてゼラチンコートとフィーダー細胞作成培地(B)を組み合わせて培養したときのMRC-5の増殖を示す図である。培養開始時のPDLとその後の継代培養時の細胞数測定から算定された培養終了時のPDLを記載した。

【図9】実施例5においてコラーゲンコートとフィーダー細胞作成培地(B)を組み合わせて培養したときのMRC-5の増殖を示す図である。培養開始時のPDLとその後の継代培養時の細胞数測定から算定された培養終了時のPDLを記載した。

【書類名】図面

【図1】

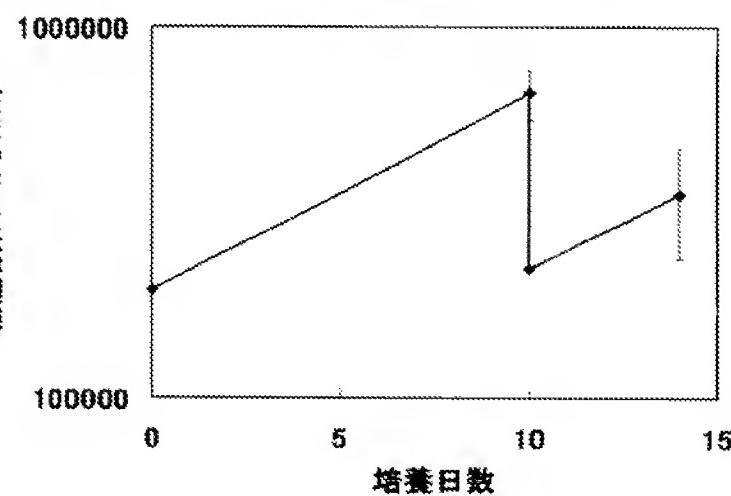


【図2】



【図3】

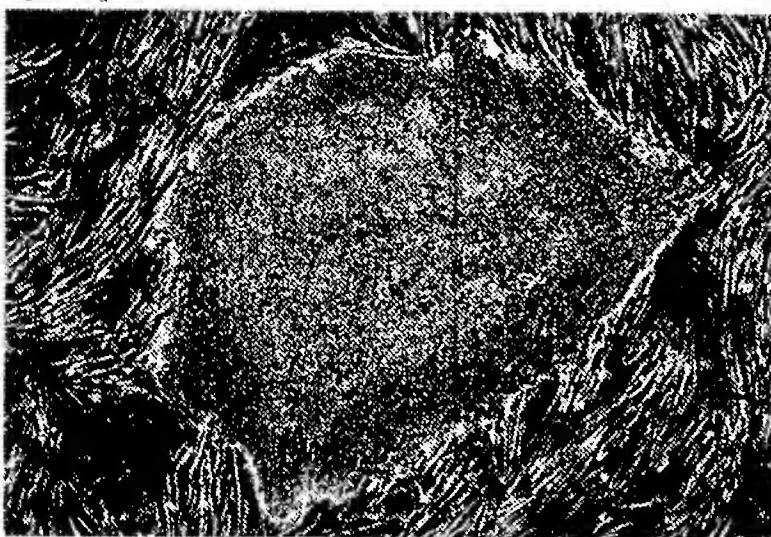
実施例2で作成したフィーダー細胞によるカニクイザル  
ESの増殖



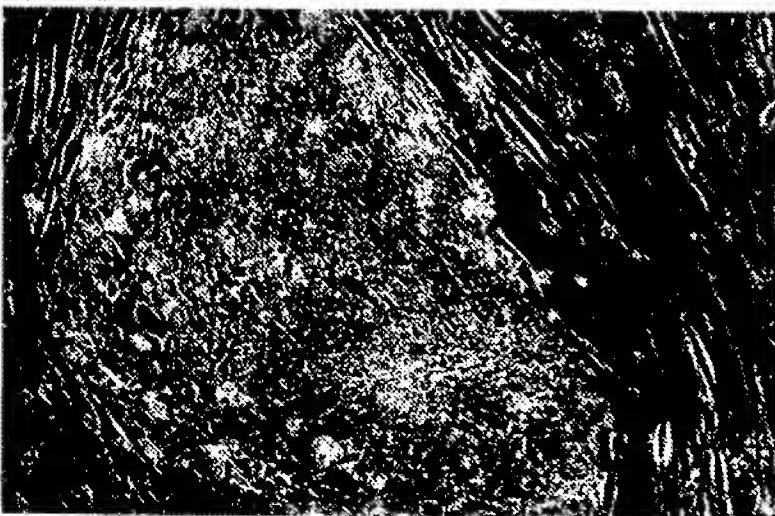
【図4】



【図5】

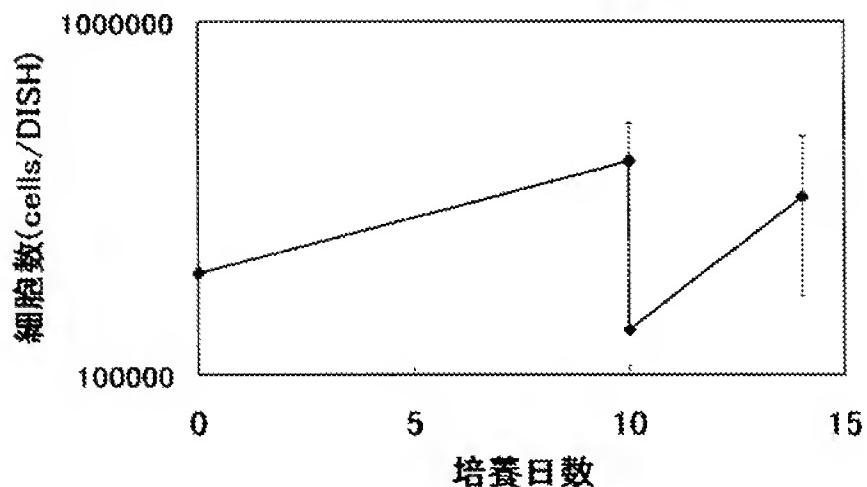


【図6】



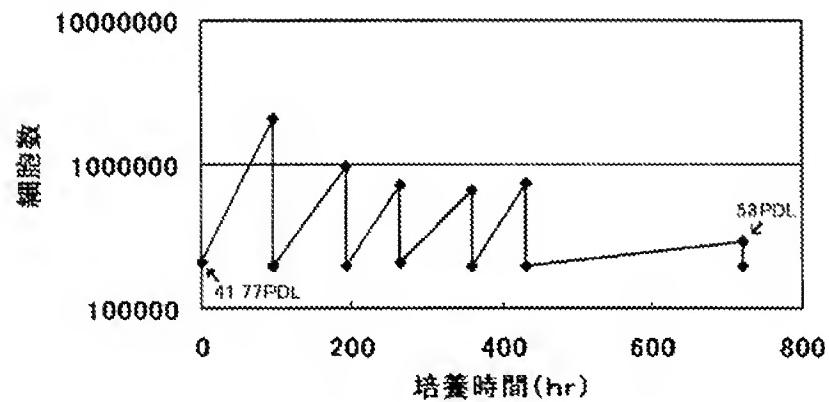
【図7】

実施例3で作成されたフィーダーによる  
カニクイザルESの増殖



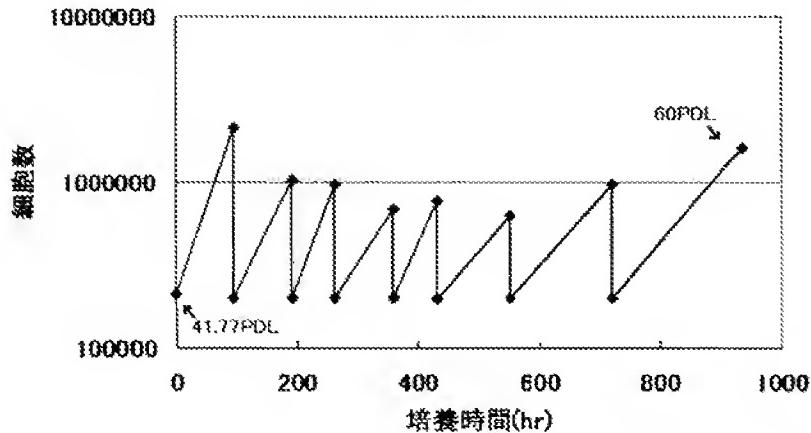
【図8】

ゼラチンコートとフィーダー用培地(B)を組み合わせたとき  
のMRC-5の増殖



【図9】

コラーゲンコートとフィーダー用培地(B)を組み合わせたとき  
のMRC-5の増殖



【書類名】要約書

【課題】 ヒト胚性幹細胞を含めた胚性幹細胞の培養に用いられるフィーダー細胞を、限られたドナー由来の材料から効率的に樹立し、感染のおそれの少ない状態で培養しうる胚性幹細胞用フィーダー細胞作成培地を提供することである。さらに、ヒト胚性幹細胞を含めた胚性幹細胞と共に培養しても比較的安全なフィーダー細胞の製造方法、および、それによって得られるフィーダー細胞を提供することである。

【解決手段】 基本培地に少なくとも血清アルブミンおよびインスリンを含む胚性幹細胞用フィーダー細胞作成培地により、胚性幹細胞のフィーダー細胞と成り得る胎児表皮線維芽細胞、胎児筋線維芽細胞、胎児肺線維芽細胞、胎児上皮細胞、胎児内皮細胞、成体表皮線維芽細胞、成体肺線維芽細胞、成体上皮細胞、成体内皮細胞から選択される少なくとも1種の細胞種を含む細胞集団を安定に増殖できる。